

糸状菌Aspergillus属の産出する -1,3-D-glucanaseに関する研究

著者	織田 健
号	737
発行年	2002
URL	http://hdl.handle.net/10097/16727

氏 名(本籍)	お 織 だ 田 けん 健
学 位 の 種 類	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 7 3 7 号
学位授与年月日	平 成 15 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻	東北大学大学院農学研究科応用生命科学専攻 (博士課程)
学位論文題目	糸状菌 <i>Aspergillus</i> 属の産出する β -1, 3-D-glucanase に関する研究
論文審査委員	(主 査) 教 授 中 島 佑 (副 査) 教 授 五 味 勝 也 教 授 西 森 克 彦

論文内容要旨

序論

酵母や糸状菌をはじめとする真菌類の細胞壁は主として多糖より構成されており、glucan、chitin、および mannose を主構成糖とする heteroglycan が細胞の剛性や弾性、形態を決定している。なかでも真菌の細胞壁の成分の約60%を占める不溶性の β -glucan と chitin は細胞壁の骨格を形成する非常に重要な構造体である。これまでに真菌類の β -1,3-glucan に関しては、化学構造に関する研究、生合成、代謝に関する研究が古くから数多く行われてきた。

とりわけ、加水分解酵素 β -1,3-glucanase は真菌、細菌、高等植物、藻類などに普遍的に存在する事が知られ、多くの研究者により広範囲にわたり調べられている。高等植物では、カビの侵食に対する防御機構として抗真菌作用を示すために、exo- β -1,3-glucanase が感染と共に急速に誘導発現される。真菌では、 β -1,3-glucan synthase と β -1,3-glucanase が、その協同作用することで細胞壁の伸張、胞子の形成に関与し、また一方、細菌の β -1,3-glucanase は、菌体外に存在する β -glucan の資化に関与することが分かっている。真菌の β -1,3-glucanase の研究は細胞壁の形態形成時におけるグルカン鎖の修飾と組換えの機構、また自己消化の機構を明らかにするために重要である。

真菌類の β -1,3-glucanase で、遺伝子が単離された数少ない例として、exo- β -1,3-glucanase (Exg)があり、本酵素のホモログが、これまでに細菌、酵母、植物など多くの存在し、酵母において、その性質が詳しく調べられている。一方、糸状菌では、Reese と Mandel らにより、網羅的に分泌型の β -1,3-glucanase が調べられ、140に及ぶ真菌のうち96% がその培養液中に β -1,3-glucanase を分泌するという報告がなされている。

本研究室では、笠原らにより、麹菌 *Aspergillus saitoi* の exo- β -1,3-glucanase が単離されその性質が明らかにされた。本酵素は、酵母由来のExgとは β -1,3-glucan に対する作用様式が異なり、exo型の分解様式を示すにもかかわらず β -1,6-結合の分岐をも飛び越して作用するという極めて特異な性質を示した(Fig.1)。このことから、糸状菌の分泌型Exgには特有の作用機作が存在し、その構造が独特のものであることが推定されるにも関わらず、糸状菌型のExgの活性中心に関する研究は行われていない。

そこで本研究では、従来研究されている酵母型Exgとは作用様式の異なる黒麹菌 *Aspergillus saitoi* の exo- β -1,3-glucanase の遺伝子(exgS)を単離し、酵母型酵素の遺伝子と比較してその違いを明らかにし、さらに麹菌のExgが一般的に同様な遺伝子構造をもつものか類縁糸状菌である *Aspergillus oryzae* より EST (expressed sequence tag) 情報を利用して exgS のホモログ exgO を単離した。さらに、糸状菌の分泌型 Exg の機能を探る一助としてマイクロアレイを利用した遺伝子の発現解析を行ない、本酵素が固体培養特異的に発現していることを示した。一方、本酵素のユニークな作用様式を明らかにするための基礎的知見を得るために、部位特異的変異の導入によりアミノ酸の置換を行い、活性に関与するアミノ酸残基の探索を行った。

第1章 *Aspergillus saitoi* からのExgS遺伝子(*exgS*)のクローニング及び発現

本酵素の全遺伝子を取得する目的で、まずPCR法によるExgの遺伝子断片の取得について検討した。笠原により報告された本ExgのN末端アミノ酸配列、およびLys-Cペプチダーゼ消化により得られたペプチドのアミノ酸配列(Fig.2)の情報を元にオリゴヌクレオチドを合成し(Fig.4)、各々をセンスプライマー、及びアンチセンスプライマーとして*Aspergillus saitoi* ATCC14332株のゲノムDNAに対してPCRを行った。その結果、1本の特異的なバンド(329bp)の増幅(Fig.3)が確認され、シーケンスを決定した(Fig.4)。その配列には、プライマーを設計した配列と同じ配列が含まれており、正しい増幅が行われていることを示していた。

このPCRフラグメントをプローブとして*A.saitoi*のゲノムDNAを各種制限酵素で切断した断片に対してサザンハイブリダイゼーションを行い、ExgSはシングルコピーの遺伝子であることを明らかにした。全長を含むと仮定された、*Kpn I*で切断したものの4.5kbpについてサブゲノミックライブラリーを構築し、コロニーハイブリダイゼーションによりクローンを選抜した。シーケンスの結果、5'-のnon coding領域を含む、N末側4.5kbpであることが判明した。全長を含む遺伝子を得るために、さらに329bpの配列部分でプライマーを設計し合成し、*EcoRI*の6.9bpの断片を切り出し、セルフライゲーションを行い、テンプレートとしてinverse PCRを行った。数種の断片が得られたが、目的とする断片の大きさに相当するものを回収し、サブクローン化したのち各種制限酵素で切断しそのシーケンスを決定した(Fig.5)。また、48時間の固相培養におけるmRNAを抽出し、RT-PCRにより、cDNAの配列の決定を行ない、全長の遺伝子のクローニングを行なった(Fig.6)。決定した配列の推定アミノ酸配列には、40kDaおよび55kDaのN末端配列に相当する配列および内部アミノ酸配列に相当するアミノ酸配列が含まれていた。本酵素遺伝子(*exgS*)は、2823bpからなり45bpのイントロンを含み945アミノ酸をエンコードしていた。イントロンは一カ所であり、アミノ酸配列の読み枠のシフト及び、スプライシングを受ける部位は、糸状菌で保存されているgtで始まりagで終わる配列およびラリアット構造を構成するgctgacの配列が存在していた。

最初の翻訳開始コドンは、-24位~-21位に存在していた。しかし、実際の翻訳開始コドンは2番目のATG 1位~3位と推定された。このシーケンスは、糸状菌で保存されている翻訳開始共通配列の周囲の配列と一致していた。また、他の菌株でのN末端上流域のアミノ酸配列のアライメントからも、この位置であることが推定された。ネットワーク上の解析からTATAボックスの存在、および転写開始部位を推定した。5'上流域には、典型的なTATA box (TATAAA)は存在していなかったが、TATATTAが存在していた。5'-上流域のプロモーター領域には、CreA結合配列に相当する配列、つまり、CuberoとScazzocchioらにより決定された5'-SYGGRGが4カ所存在しており、強力なカタボライト抑制を受けることが考えられた。グルコースを含む培地において培養した*A. saitoi* cDNAライブラリーからはクローニングを行えなかった事実もこのことを示唆している。また、付近には、エンハ

ンサーであるCCAATの配列が3カ所存在していた。

推定アミノ酸配列内に存在する、Asn-X-Thr(Ser) 則によるN-グリコシド結合型糖鎖付加部位は11カ所で、SDS-PAGEの結果と一致して、非常に糖鎖付加の多い酵素であると考えられた。

開始メチオニンから36残基の疎水性アミノ酸残基のクラスターとそれに続くArgが存在し、この部位が精製タンパク質でのN末と一致した。*Trichoderma* 属ではKRを認識して、KEX2様プロテアーゼによりプロセッシングを受けるとされている。しかしながら、ExgSは、KEX2様シグナルペプチダーゼではなく、一塩基アミノ酸を認識する、例えば酵母で言うYapsinなどのペプチダーゼにより切断を受けて、成熟体となると考えられる。

NCBI Blast database 検索により5種類の $\text{exo-}\beta\text{-1,3-glucanase}$ が検索され、それらは *Trichoderma atroviride*(GLUC78), *Ampreromyces quisqualis*(ExgA), *Conithyrium minitans*(CMG1), *Trichoderma harzianum*(LAM1), *Cochliobolus carbonum*(Exg1) の $\text{exo-}\beta\text{-1,3-glucanase}$ ですべて exo 型のものであり、それぞれ、46.3、41.6、44.7、31.8、27.7%の相同性であった(Fig.7)。さらに、Nicol'skaya らによって報告されている多糖との結合モチーフとしての高い保存領域(繰り返しモチーフ) [GAKGDGSTDDTAI] が2カ所存在していた。また、ExgS には、他の真菌の $\text{exo-}\beta\text{-1,3-glucanase}$ と全く相同性の無い180アミノ酸からなるリンカー領域が存在しており、この配列により二つのドメインに分かれ各々の部分に多糖との推定結合モチーフが存在している。この配列部分のみを検索してもNCBI data base上には相同性のあるタンパク質は全く存在しなかった。*A. saitoi* でのこの領域は、Ser、Thr 残基が異常に多く集中しており、ハイドロパシープロット(Fig.20)から考慮して非常に親水性に富み、また55kDaのサブユニットにおいて切断を受けている部位であることからタンパク質の外表面上に存在していることが推定された。

クローニングされた *ExgS* が *Exg* をコードしているか確認するために、*ExgS* 遺伝子を硝酸還元酵素 *niaD* をマーカーとした麹菌 *Gla A* 改良型プロモーターの制御下にある高発現ベクター pNGA142 に挿入し(Fig.8)、*Aspergillus oryzae* の形質転換を行なった。得られた形質転換株を培養上清中の $\beta\text{-1,3-glucanase}$ を測定し、誘導条件下で有意に活性が上昇していることが確認され、*ExgS* は、 $\beta\text{-1,3-glucanase}$ をコードしていることが示された(Table I)。同時に *ExgS* のC末端側に His tag を付加した *ExgS*-CH を発現させたが、活性は確認されるものの抗His抗体で検出されないことから、C末端側で切断を受けていることが推定された(Fig.10)。構築した大量発現系より酵素の精製を行ない、N末端アミノ酸シーケンスを決定したところ、モルシンより精製した酵素と配列が一致し、*A. oryzae* においても正しくシグナル配列の切断が起きていることが確認された(Fig.9)。また、精製酵素の比活性、至適pH、至適温度などの性質を検討を行ない、native のものとはほぼ一致していることが確認された。このことから、*Aspergillus oryzae* を宿主とした *ExgS* の大量発現系の構築を確認した。

第2章 *Aspergillus oryzae* からのExgO遺伝子(*exgO*)のクローニング、発現および*Aspergillus* 属のExgの性質について

前章において、*exgS*の構造で明らかにされたSer 及びThrに富むリンカー領域の分子内部の存在は、*Aspergillus* 属の β -1,3-glucanaseにおいて特有な構造なのか否かを確認するために、*Aspergillus saitoi* の近縁種であり、糸状菌のモデル株となっている*Aspergillus oryzae* のExg 遺伝子のクローニングを行い、その構造を明らかにした。クローニングに際して、東北大学をはじめとする産官学協同で行われた*Aspergillus oryzae* EST プロジェクトより、EST情報を入手し、Exg に相溶性のある配列をもつESTを検索した結果、固相培養条件における培養でのみ発現が確認され2 クローンが検索された(Fig.11)。そのクローンを酒類総合研究所より供与頂き、新たにシーケンスを行い、3'側polyA配列より上流1500bpの配列を明らかにした。このESTクローンで得られた情報を元にプライマーを設計し、Inverse PCR により全長遺伝子の取得し、シーケンスを決定し、*exgO*と名付けた(Fig.12)。*exgO*は、2888 bp からなり48bpのイントロンを含み946アミノ酸をエンコードしていた。*A. oryzae* のExgOにも、内部に180アミノ酸からなるリンカー領域が存在し、そのアミノ酸の構成は、ExgS とは異なりSer およびPro に富んでいた(Fig.15)。

本遺伝子産物の発現が固相培養条件において特異的であることを確認するために、液体培養および小麦ふすまでの経時的な固体培養を行なった*Aspergillus oryza* RIB40 よりmRNAの抽出を行ない、マイクロアレイによる発現解析を行なったところ、固相培養27時間においてシグナルが検出され、液体培養においてはシグナルは存在しなかった(Fig.14)。また、*ExgS* のクローニングをする際に、液体培養中のcDNAライブラリーにおいてはExgS が存在していなかったことから、Exg遺伝子は固体培養に特異的な発現を示す遺伝子であることが示唆された。

実際にクローニングを行なった *ExgO*遺伝子産物が *exo-β*-1,3-glucanase であることを確認するため、ExgS と同様に発現ベクター(Fig.15)を構築し、麹菌の形質転換を行なった。得られた形質転換体の培養上清中のExg 活性を測定したところ、誘導条件下で有意に活性の上昇が確認された(Table.2)。このことより、クローニングを行なった*exgO* 遺伝子は、 β -1,3-glucanaseをコードしていることを確認した。

現在までにクローニングが既に終了し、NCBI data base中に存在している糸状菌のendoおよびexo型の β -1,3-glucanase、および*A. nidulans*の全ゲノム配列を決定しているCereon 社の非公開のdata baseより *exgS* 遺伝子に相当する部分配列を見出し、その配列と共にExgSおよびExgOについて系統樹の作製を行なったところ、*Aspergillus* 属のExgは内部にリンカー領域を保持していることから一つのグループを形成していることが明らかとなった(Fig.17)。つまり、このリンカー領域が*Aspergillus* 属に特有なものであることが示唆され、何らかの機能を有していることが推察された。

第3章 内部非保存配列 (ST rich region) および酵素の構造解析

第2章において、ST rich region が *Aspergillus* 属に特異的なものであることが示され、本酵素は非常にユニークな構造をしていることが確認された。このST rich region の切断性を検討し、酵素の成熟化についての解析を行なった。取得されたアミノ酸配列情報より、2次構造予測及びハイドロパシープロット(Fig.20)の解析を行ない、Ser 及びThr に富むリンカー領域は、酵素分子の表面領域に存在していると考えられ、プロテアーゼに曝されやすい環境となっていることが確認された。既に、55kDa のサブユニットのN末配列は、ST rich region 内に存在していることが第1章にて明らかにされている。そこでさらに2カ所目での切断がこのST rich region で起こり、ST rich region は完全に切除され、最終産物として他の種のExg と構造上は一致した形で菌体外に存在しているものと予想された。

ExgS は、精製終了産物において、Native PAGE では一つのバンド、SDS-PAGEを行うと40、55 kDa の二つのバンドを示した(Fig.2)。変性させた酵素をendoglycosidase HによりAsn 結合型糖鎖の脱糖鎖処理を行い、SDS-PAGEにて分析した結果、40 kDaのサブユニットは、約38 kDaにバンドがシフトし、55 kDaのサブユニットの分子量に変化はほとんど生じていなかった(Fig.17)。分子量から判断して、40 kDa のサブユニットはFig.19 に示した領域で切断を受けていると考えられた。この切断を受けると推定される部位は、プロテアーゼ分解のシグナルとなる領域を探索するPEST解析での推定切断領域と良く一致していた。また、推定切断領域の近傍には共に**TVTKXR**配列が保存されており、何らかの機能を有する配列であることが推定された。さらに、両サブユニットをSDS-PAGEにて分離し、我々が開発したIn gel deglycosylation法により糖鎖除去を行なった後、MALDI-TOF MSを用いたPeptide mass finger printing解析により、それぞれのサブユニットを構成するペプチドの存在を確認した(Fig.19)。しかしながら、リンカー領域を構成するペプチドの質量を示すピークが検出されなかったことより、リンカー領域が予め切断されていることが示唆された。また、両サブユニットの結合について着目したところ、ExgSの推定アミノ酸配列中には、15個のシステイン残基が存在しジスルフィド結合にて二つのサブユニットが結合していることが予想された。しかしながら、非還元条件下においてSDS-PAGEに供しても、二つのサブユニットが確認されることから、両者の結合はシステインを介したジスルフィド結合によるものではないことが推定された(Fig.18)。また、55kDaのバンドの移動度の変化から、55kDaのサブユニットには少なくとも1カ所のシステインを介したジスルフィド結合が存在することを示した。さらに、DTT処理を行なったExgSには、活性が確認できないことから、そのジスルフィド結合が酵素の構造を保つ上で活性に必須であることが推定された(Table.3)。

以上の結果より、ExgS は、ER 内にてタンパク質のフォールディングが完成し、ゴルジ体にて糖鎖の修飾を受けた後、分泌過程での分泌顆粒内あるいは、菌体表面に存在するKex 様プロテアーゼをはじめとするプロテアーゼによって内部のSer 及びThr に富むリンカー領域の切除を受け、その結果、他の種のExg と構造上は一致した形で菌体外に存在しているものと推定された。

第4章 Exgの活性に関与するアミノ酸残基の検索

本酵素のユニークな作用様式の解明の基礎的知見を得るために、部位特異的変異の導入によりアミノ酸の置換を行い、活性に関与するアミノ酸残基の探索を行った。活性中心に関与する残基の探索を行なうに際して、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* でのExgSの発現系の構築を行ない、活性を確認した。宿主自体にも β -1,3-glucanaseが存在しているが、誘導条件において宿主由来のExg活性は検出されなかった(Table.4)。このことより、部位特異的変異を導入した mutant の評価系の構築が行なえた。

糖質分解酵素の活性中心に関与するアミノ酸残基は、一般的に活性カルボキシル基を持つアミノ酸と言われ、アスパラギン酸、グルタミン酸が候補とされる。exoおよびendo型の活性に関与するアミノ酸残基は本質的に同じであると考えられることから、これまでに遺伝子情報が明らかとなっている糸状菌のexoおよびendo型の β -1,3-glucanaseのアライメントを行ない、両者およびexo型のみで保存されているアスパラギン酸、グルタミン酸の選出を行なった(Fig.24)。また、活性に関与するアミノ酸残基は、立体構造的には α -helixや β -sheetなどの2次元的な構造中ではなく、ループあるいは立体構造の端に位置していることが多いと予測されることから、2次構造予測およびHydropathy cluster analysis (Fig.25)を行ない候補としたアミノ酸の立体位置を確認し、26アミノ酸を候補とし部位特異的変異によるアミノ酸置換のターゲットとした。Nikolskayaらにより推定された糖質分解酵素において高度に保存されている2つのモチーフ内に存在するアミノ酸(D75N、D78N、D79N、D587N、D591N、D592N)は、基質との結合に関与していると考えられ候補とした。酵母や大麦の β -1,3-glucanaseとは、全体の配列においてはExgSとの相同性は存在しないが、局所的には活性に関与するアミノ酸残基と報告されている領域[KIVGEWP]においてホモロジーが高く、このアミノ酸残基(E623Q)が糸状菌においても同様の役割を担っていることが推定され候補とした。

候補としたアミノ酸の部位をアスパラギン酸はアスパラギン、グルタミン酸はグルタミンに置換し、シーケンスを確認後、酵母発現ベクターpYESに変異遺伝子を挿入し、酵母の形質転換を行なった。誘導条件下で48時間培養した後の形質転換体の培養上清を粗酵素として、濃縮、部分精製を行なった後、活性を測定した(Fig.26)。その結果、酵母において報告されていた活性求核残基(E623Q)では、逆に比活性の上昇が確認され、活性に関与していないことが示唆された。このことから、糸状菌においては異なった部位に求核残基が存在している事が示唆された。また、高度に保存された繰り返しモチーフ内に存在するアスパラギン酸(D75N、D78N、D79N)の置換を行なった結果、D75N、D79Nにて有意に活性が減少しており、この領域が基質の結合あるいは、活性中心に関与していることが示唆された。

要約

本研究では、糸状菌 *Aspergillus* 属の産生する $\text{exo-}\beta\text{-1,3-glucanase}$ を実験材料として、遺伝子のクローニング、発現解析を行ない、以下の事柄を明らかにした。

- ・黒麹菌 *Aspergillus saitoi* より $\text{exo-}\beta\text{-1,3-glucanase}$ 遺伝子 (*exgS*) のクローニングを行い、その構造を明らかにした。

- ・ *Aspergillus oryzae* および、*Saccharomyces cerevisiae* を宿主として、ExgS の発現系の構築を行なった。

- ・類縁の糸状菌 *Aspergillus oryzae* の $\text{exo-}\beta\text{-1,3-glucanase}$ 遺伝子クローニングを行い全塩基配列を決定し、*Aspergillus* 属特有のタンパク質構造の存在を示した。

- ・ *Aspergillus* 属の $\text{exo-}\beta\text{-1,3-glucanase}$ (Exg) は、内部に Ser, Thr あるいは Ser, Pro に富む約180アミノ酸から成るリンカー領域をもっており、その領域は、分泌される際に切除されている可能性を示した。

- ・EST 情報およびマイクロアレイを用いた遺伝子の発現解析により、*Aspergillus* 属の Exg 遺伝子は固相培養特異的に発現することを示した。

- ・部位特異的アミノ酸の置換により活性に関与するアミノ酸残基の探索を行ない、高度に保存された領域内に存在する Asp75、Asp79 が基質との結合あるいは活性に関与することを示唆した。

原著論文

1) Ken Oda, Shin Kasahara, Youhei Yamagata, Keietsu Abe, and Tasuku Nakajima,

Cloning and expression of $\text{exo-}\beta\text{-D-1,3-glucanase}$ gene (*exgS*) from *Aspergillus saitoi*.

Biosci. Biotechnol. Biochem. , 66(7), 1587-1590, 2002

2) Ken Oda, Osamu Akita, Keietsu Abe, and Tasuku Nakajima,

Cloning and expression of $\text{exo-}\beta\text{-D-1,3-glucanase}$ gene (*exgO*) from *Aspergillus oryzae*.

(Manuscripts in preparation.)

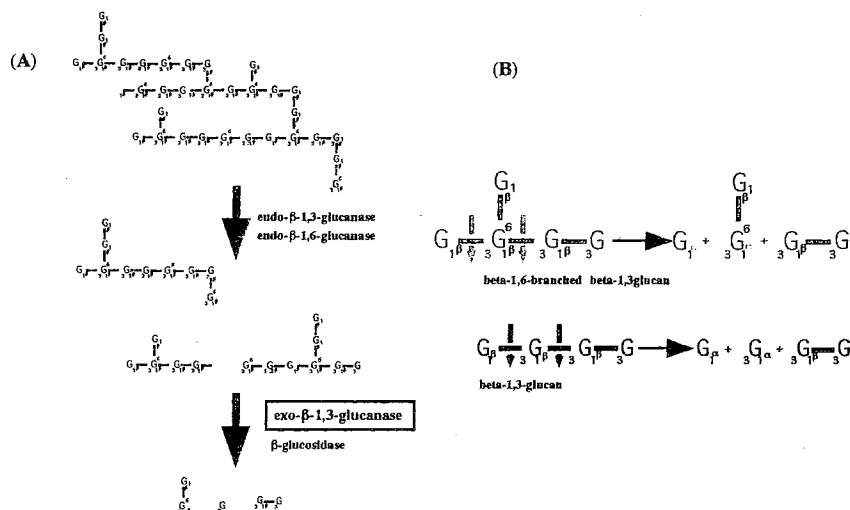


Fig.1 The model of cell wall β -glucan depolymerization by β -glucanase(A) and action pattern of *Aspergillus saitoi* exo- β -1,3-glucanase(B).

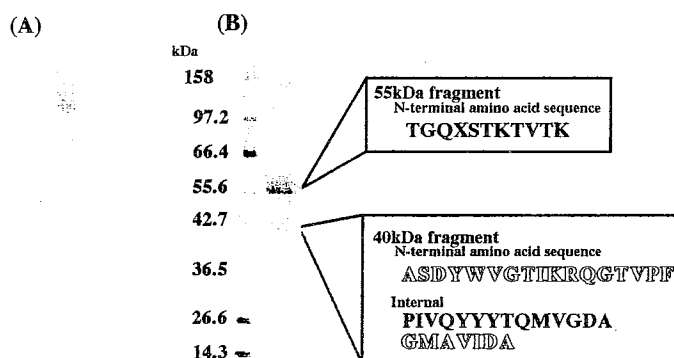


Fig.2 Native (A) and SDS-PAGE (B) analysis of purified β -1,3-glucanase from Molsin and amino acid sequences of each fragments.

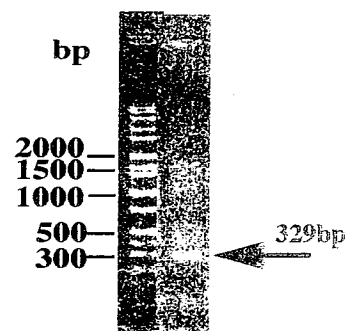


Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified with N4-Ia1 primer.

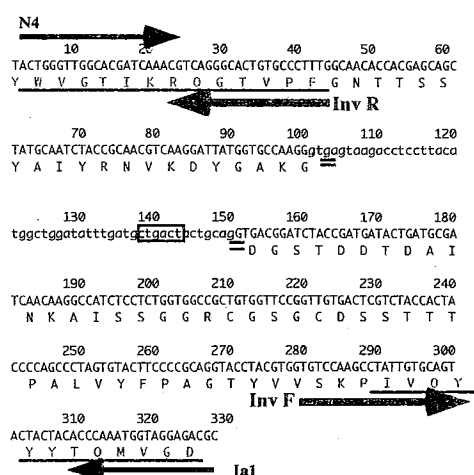


Fig.4 Nucleotide sequence of PCR product and its deduced amino acid sequence and oligonucleotide primers for Inverse PCR.

The PCR primers are shown by the arrows. Blue arrows indicate primer for InversePCR. The putative RNA splicing sequence is indicated by the box. Double underlines indicate putative intron sequences. Amino acid sequences found by directed sequencing are underlined.

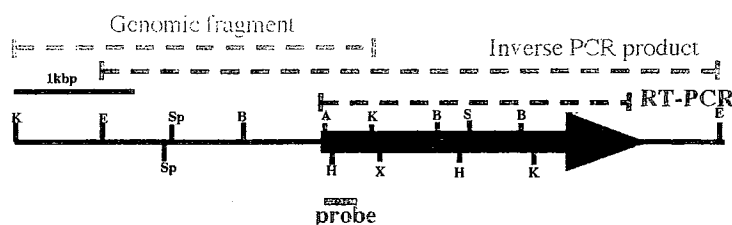


Fig.5 Restriction map and sequencing strategies of *A. saitoi* exo- β -1,3-glucanase gene. The positions of the three overlapping fragments that were sequenced are shown by broken line. A, *Acc* I; B, *Ban* H I; E, *Eco* R I; H, *Hinc* II; K, *Kpn* I; S, *Sma* I; Sp, *Spe* I; X, *Xho* I. The black bold arrow indicates the position of the exo- β -1,3-glucanase coding region.

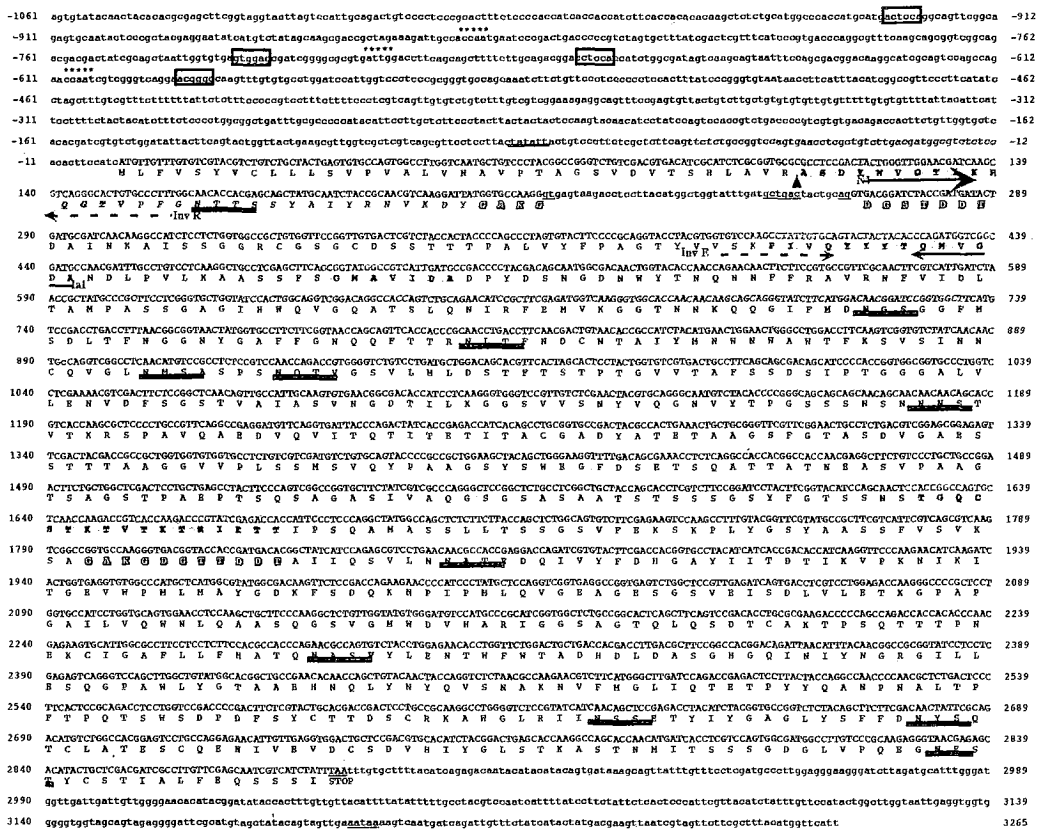


Fig. 6 The Nucleotide and putative amino acid sequences of exo-β-1,3-glucanase from *A. saitoi*.

Putative TATA and CAAT boxes in the 5'-noncoding region are underlined and asterisked. Consensus sequence in introns, and a putative polyadenylation signals in the 3'-noncoding region are also underlined. Putative signals for regulatory proteins implicated in regulation by carbon source (CreA), are indicated with open box in the promoter region. The peptide sequences obtained from the purified enzyme are indicated with gray highlighted; the first one is from the N-terminus of the mature protein (closed triangle). The nucleotide sequences used for primer designing are indicated by underlining with arrows and broken arrows. Double underlines indicate the putative asparagine glycosylation sites. The conserved sequences in exo-1,3-β-D-glucanase are indicated with white shadow letters. The nucleotide sequences of *exgS* gene have been submitted to the DDBJ/EMBL/GenBank database under the accession number No. AB070739.

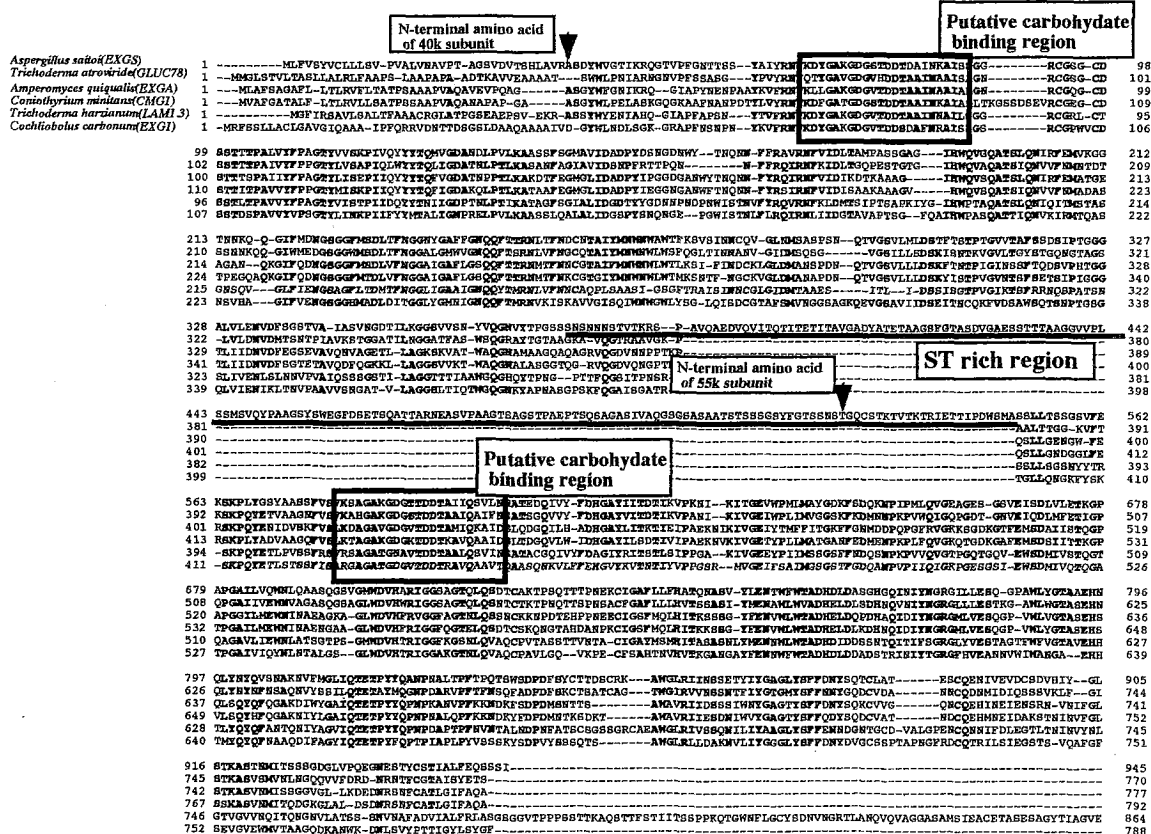


Fig. 7 Alignment of amino acid sequences of fungal exo-β-1,3-glucanase.

Identical residues are indicated by bold letters. The C-terminus of LAM1.3 of *T. harzianum* shows no homology to those of other enzymes and therefore the region is not shown. The arrow indicates the signal peptide cleavage site. Two boxes indicate high conserved region of the β-1,3-glucanases, in which the presence of putative substrate binding regions are reported by Nikolskaya. The under line indicates non conserved linker region which is found only in *A. saitoi*. The maximum sequence homology and alignment of the deduced amino acid sequences were searched for with GENETYX-Mac 8.0 (Software Development Co., Tokyo, Japan).

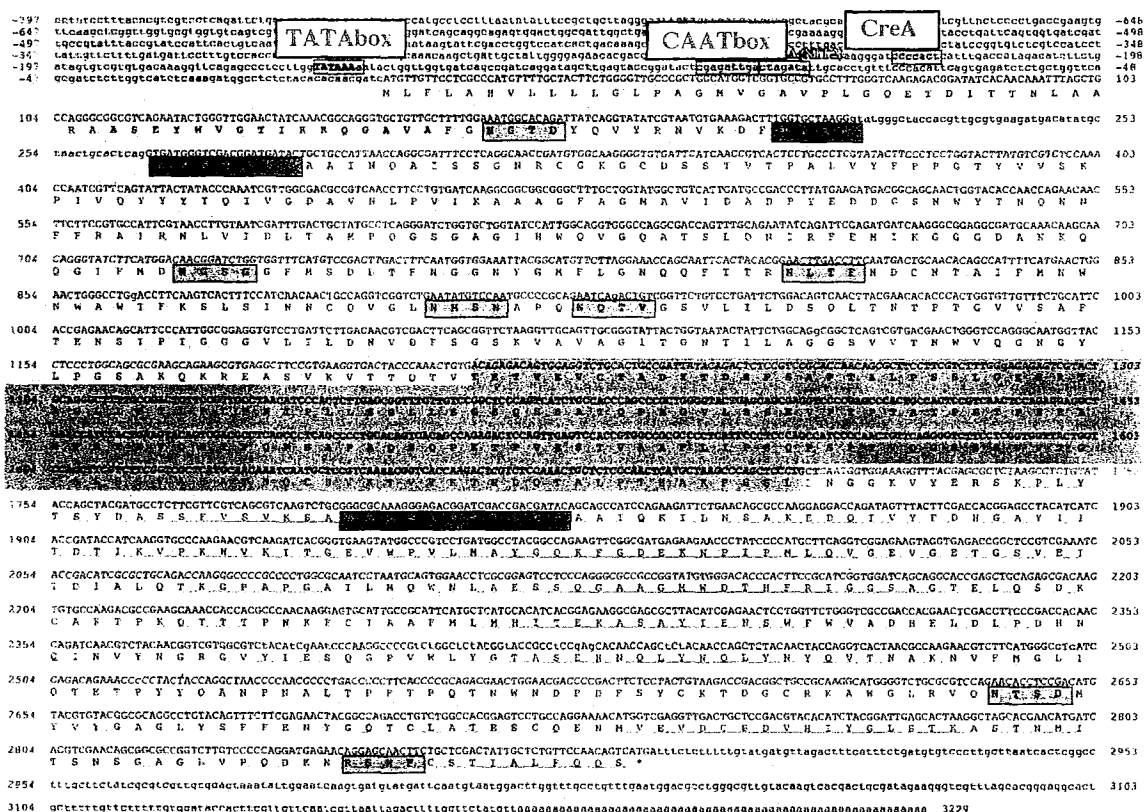


Fig.12 The nucleotide and putative amino acid sequences of exo-β-1,3-glucanase from *A. oryzae*.

Putative signals for regulatory proteins implicated in regulation by carbon source (CreA), are indicated with open box in the promoter region. The yellow boxes indicate the putative asparagine glycosylation sites. The conserved sequences in exo-β-1,3-glucanase are indicated with white shadow letters within red boxes. The nucleotide sequences of *exoO* gene have been submitted to the DDBJ/EMBL/GenBank database under the accession number No. AB074847.

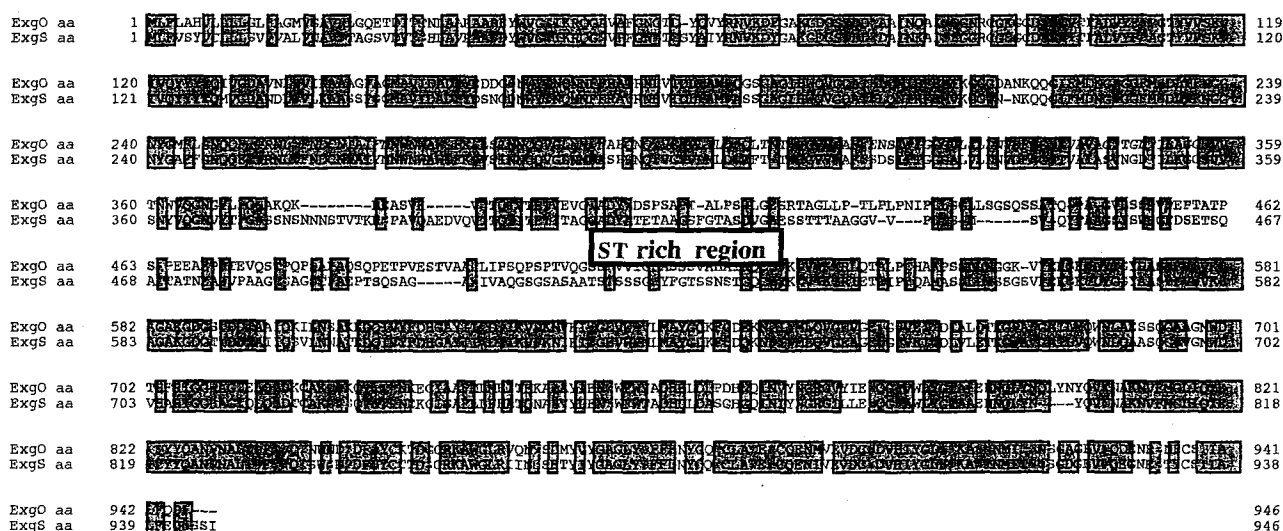


Fig.13 Comparison of amino acid sequences of ExgO and ExgS.

Non homologous linker region is highlighted with yellow box. Ser, Thr, Pro residues within linker region are indicated red colored. Blue boxes indicate homologous sequences with ExgS and ExgO.

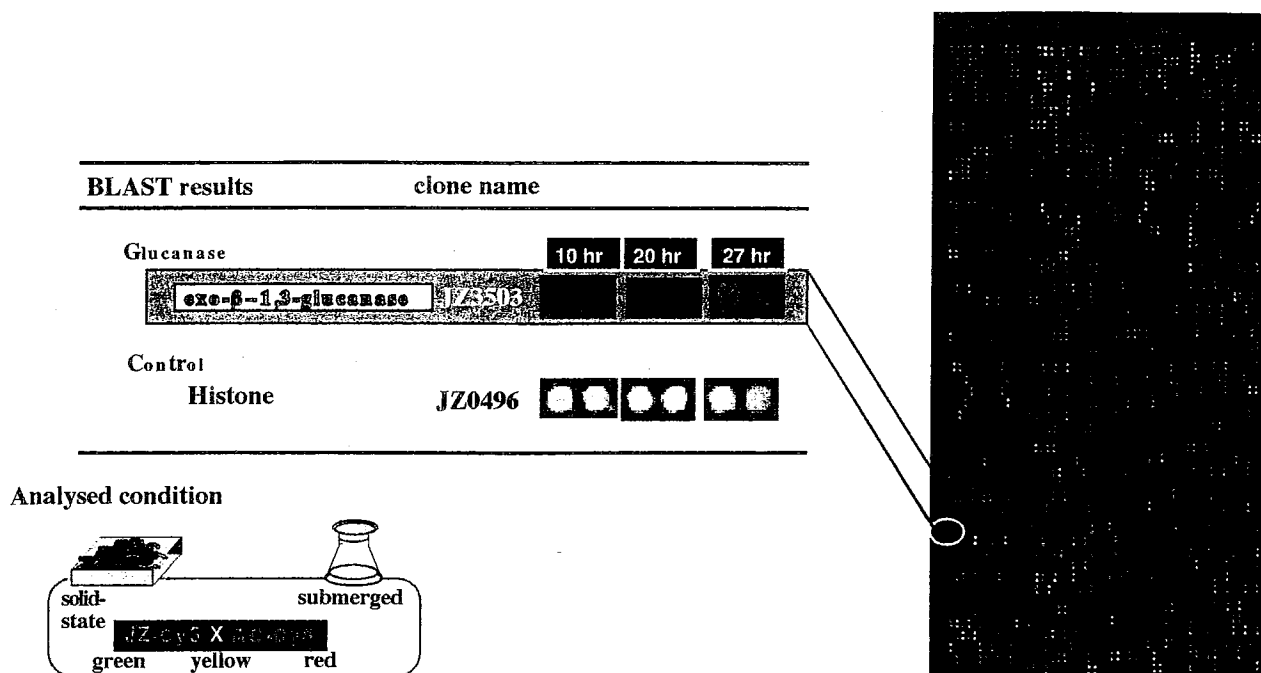


Fig.14 Expression condition analysis of β-1,3-glucanase gene by cDNA microarray.

mRNA was extracted from *A.oryzae* cultured with YPD liquid medium for 22hrs and with weat blan for 10, 20, 27hrs. cDNA was prepared with Superscript II and labeled with Cy3 (solid) and Cy5 (liquid). Each competitive hybridization with equal amounts of labeled cDNA was performed twice.

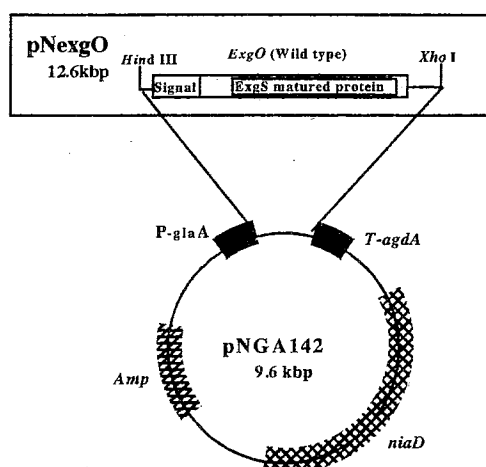


Table 2 Beta-1,3-glucanase activity of culture supernatant (CD medium) of *A. oryzae* transformant carrying pNexgO.

plasmid used	carbon source	total activity (U/50 ml cultural sup.)	total protein (mg)	specific activity (U/mg)
none (host only)	glucose	n.d.	3.90	—
	maltose	n.d.	4.70	—
pNGA141 (blanked vector)	glucose	n.d.	5.85	—
	maltose	n.d.	3.80	—
pNexgS	glucose	0.252	4.40	5.73×10^{-2}
	maltose	0.295	4.25	6.94×10^{-2}

Approximately 1×10^6 conidiospores of *A. oryzae* transformants were inoculated into 50ml of YPD medium and incubated at 30°C for 24hours and mycelia were separated by filtration, after washing with water, transplanted to CD medium containing 20% glucose or maltose, then cultured at 30°C for 24hours. Cultural broth was dialyzed against 10 mM sodium phosphate buffer, pH 5.0, then enzyme assay was performed by the standard method. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme that catalyzed the hydrolysis of 1 μmol of glucosidic linkage per min. under the assay condition.

Fig.15 Construction of pNexgS for expression of exgS in *A. oryzae*.

The 3.1 kbp DNA fragment including the *exgS* gene was inserted into the *Hind* III site of pNGA142, named pNexgS. *A. oryzae* nialD300 was transformed with the resulting plasmid and positive clones were screened by colony-PCR.

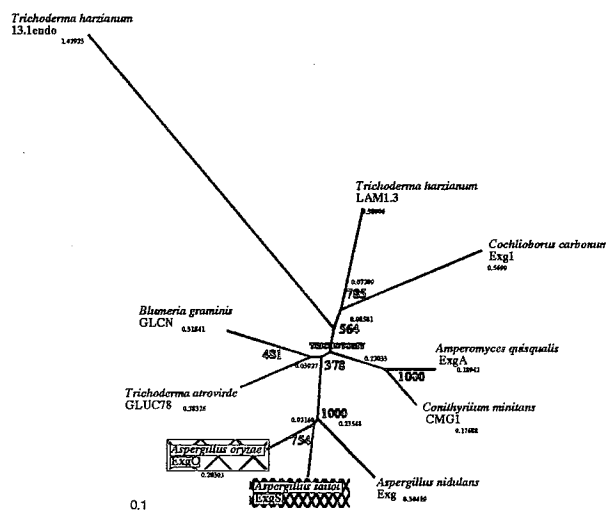


Fig. 16 Phylogenetic tree for the deduced amino acid sequences of β-1,3-glucanase from filamentous fungi. Analysis was done using the NJ method by ClustalW. Bootstrap value was indicated with shadowed.

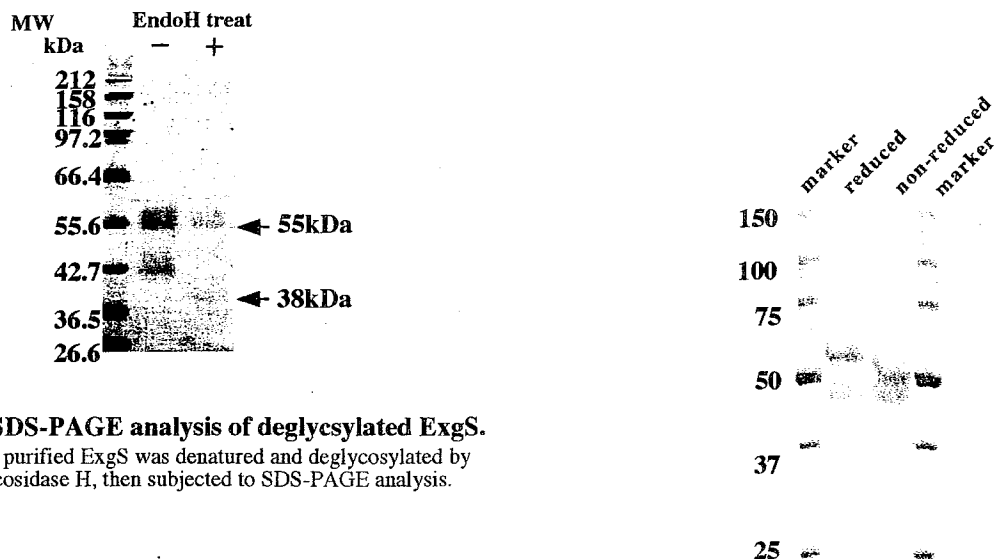


Fig.17 SDS-PAGE analysis of deglycosylated ExgS.

10 µg of purified ExgS was denatured and deglycosylated by endoglucosidase H, then subjected to SDS-PAGE analysis.

Table3 Relative activities of ExgS treated with deglycosylation and DTT.

Non treatment ExgS activity was indicated as 100% and relative activity of treated ExgS activities were described.

treatment	Relative activity(%)
non treatment	100
DTT	N.D.
Deglycosylation	105

Fig.18 SDS-PAGE analysis of DTT treated ExgS.

SDS sample buffer including 10mM DTT was added to ExgS and boiled. Same treatment without DTT was subjected in non-reduced condition.

1	MLFVETVCLLSVPTALVNAVPIAGSDVDTSRILAVRGGH	YVQTHKTRDQ	YVYVMTSE	YATIRNVDKY	GRKGGSTID
81	TDINKAISEGGRGSGGCSSTFPALVTPAGTIVVSKP	IVQITITGV	GDANDLPVLK	AAHFSCHAV	TDAPFDGNG
161	DINITIMONNFRAVENFYIDLTAMPASSGA	GIRNQVQAT	SLQNIREFV	KSGINRQCD	IPDNHGGF
241	YQAFNGQGF	TIRNUIFND	HTALIMNNM	AMTYKEVIN	NCQVULMGA
321	DSIIPGGGAL	NGD	TILKGGSVVS	NIYGVNITP	GSSANENKNS
401	YVETITACQ	DYETETAGS	FQFESDVGA	ASTPCHAGGV	YELSGHVGIT
481	GTETSTPE	PTSGAGAS	VAGQSGGAS	ATGTSRGGY	GTSEN
561	VFERKPLIG	SYAASFFVEV	KRAGAKGDT	TODTALIQSV	LNNATEDQIV
641	AYGDFSDQK	NPIMLQVSE	AGESGVEIS	DVLETKGPA	PMALVQNL
721	AKTPSGTITP	NERCIGAFLL	FRATQNAVY	LENCHFWAD	HOLDASGHOQ
801	NIQVSNAKNV	FMILQITETP	IIQANPHAL	PTTPQMSMD	PDFSCTTDS
881	QTLATESCQ	ENIVEVCSO	WHIIGLSTKA	STOMITSSRG	DGLVPQEGNE

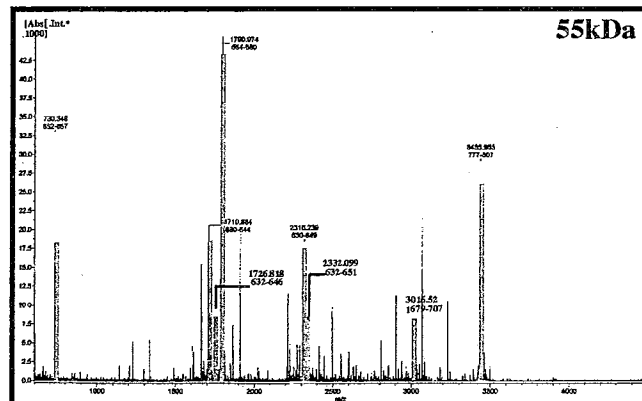
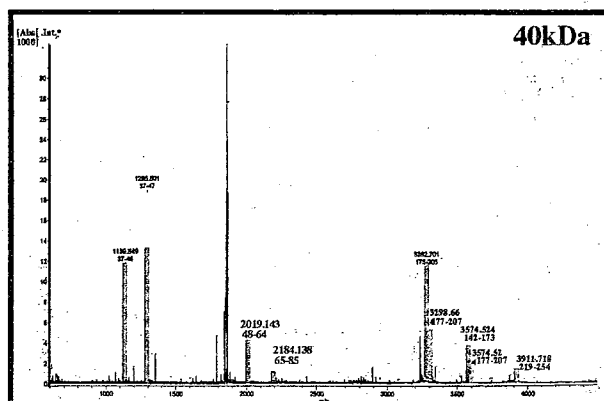


Fig.19 Peptide mass finger printing of 40kDa and 55kDa subunits and their locus in ExgS amino acid sequences.

10µg of purified ExgS was loaded on SDS-PAGE and each subunit were seperated. The bands of each subunit was excised, destained and dried up. Then, the gels were subjected to alkylation, in gel deglycosylation, and trypsin digestion. The peptide products were extracted and peptide mass finger printing were obtained by MALDI-TOF Mass spectrometer. Deduced PEST regions which are found by PEST find (<http://www.embnet.org/embnet/tools/bio/pestfind/about.html>) are indicated red bald type with Open box.

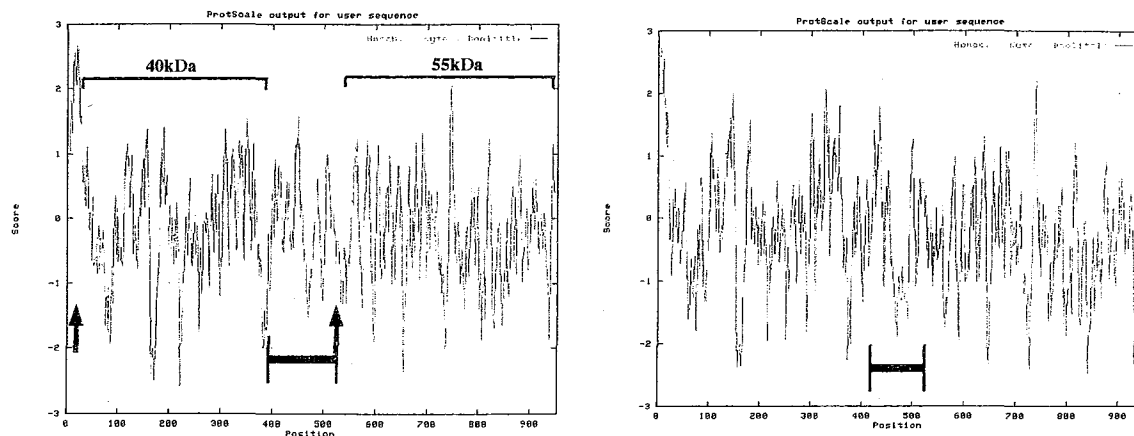


Fig.20 Hydropathy profile of deduced amino acids sequences of ExgS and ExgO

Hydrophobicity was analyzed by ProtScale (<http://www.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl>). Ser Thr rich linker region is marked by bald line. N terminus amino acids of 40k and 55kDa subunit are marked with arrow. Ser Thr rich region indicates hydrophilicity.

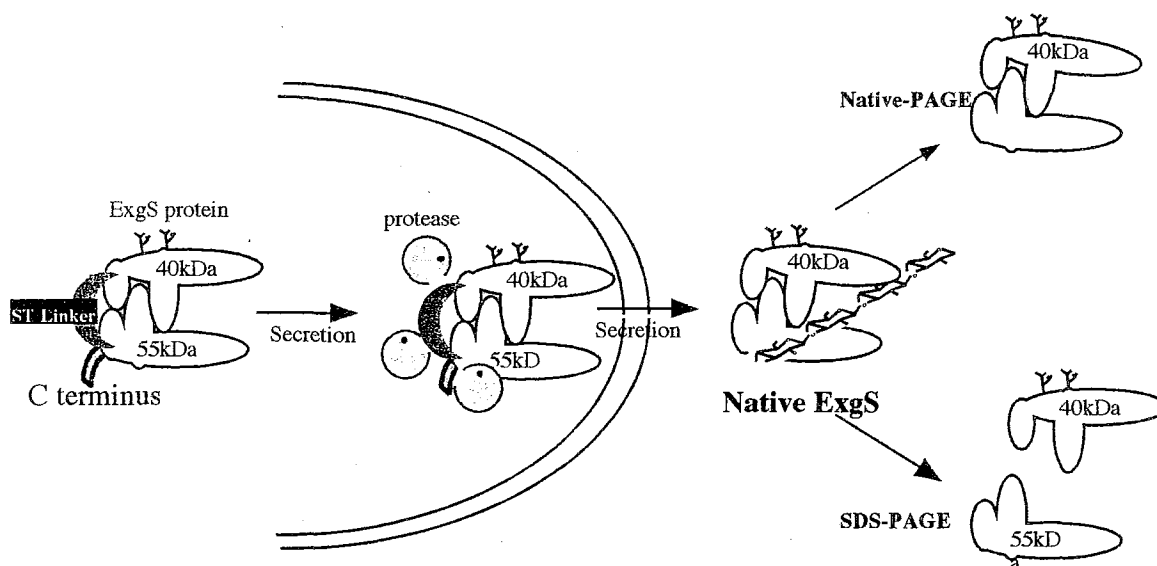


Fig.21 Model of ExgS structure.

In secretion pathway, ST rich region and C terminal region deduced to be scissled off by protease.

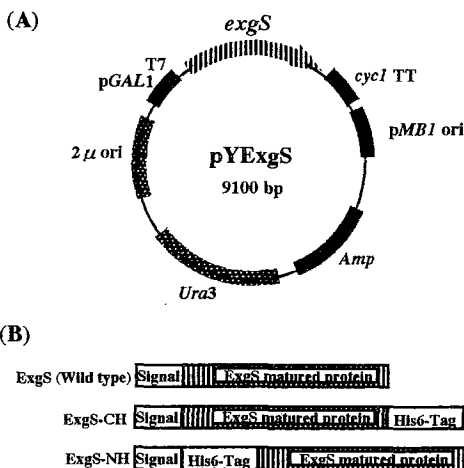


Fig.22 Structure of expression plasmid pYExgS for production of β -1,3-glucanase in *S. cerevisiae* (A) and designed protein (B).

Expression plasmid pYExgS was constructed with *Hind* III-*Xba* I fragment containing ExgS gene with His tag sequence.

Table 4 Beta-1,3-glucanase activity of the culture supernatant(CM medium) of *S. cerevisiae* transformant with pYexgS.

plasmid used	cultured time(hours)	total activity (U/100 ml cultural broth)	total protein (mg)	specific activity (U/mg)
none	12	n.d.	2.34	—
pYES2	12	n.d.	2.95	—
	24	n.d.	2.62	—
	36	n.d.	4.67	—
pYexgS	12	n.d.	2.66	—
	24	5.95×10^{-2}	3.74	1.59×10^{-2}
	36	1.15×10^{-1}	5.51	2.09×10^{-2}

1U is indicated the amount of activity that release 1 μ mol glucose for 1 min.

Fig.23 SDS-PAGE analysis of recExgS expressed by *S. cerevisiae*.

Recombinant ExgS expressed with *S. cerevisiae* were partial purified with absorption to Curdran followed by DEAE Sepharose column chromatography. 10 μ g of purified recExgS(wild type) from *A. oryzae* and 200 μ g of partial purified protein was loaded on the gel. The gel was run under reducing conditions and stained with CBB R-250.

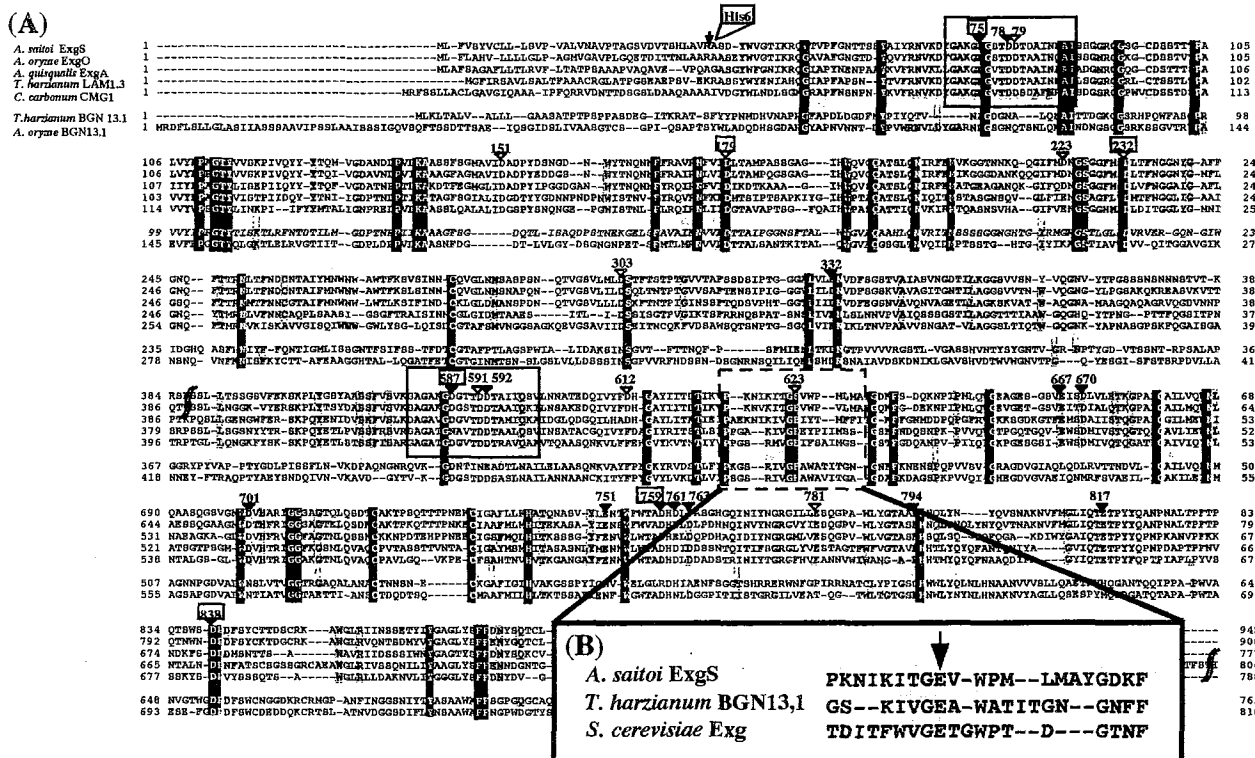
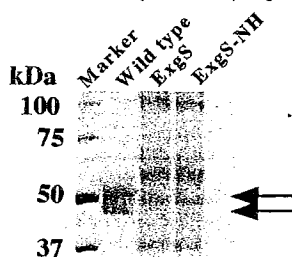


Fig.24 Comparison of amino acid sequences of fungal β -1,3-glucanase (A) and alignment of active nucleophile region (B).

Target sequences of point mutation are numbered and gray open boxes indicate homologous sequences with exo and endo type β -1,3-glucanase. Two open boxes indicate high conserved region of the β -1,3-glucanases, in which the presence of putative substrate binding regions are reported by Nikolskaya. The C-terminus of LAM1.3 of *T. harzianum*, and internal of *A. saitoi* ExgS and *A. oryzae* ExgO show no homology to those of other enzymes presented and therefore the region are not shown.

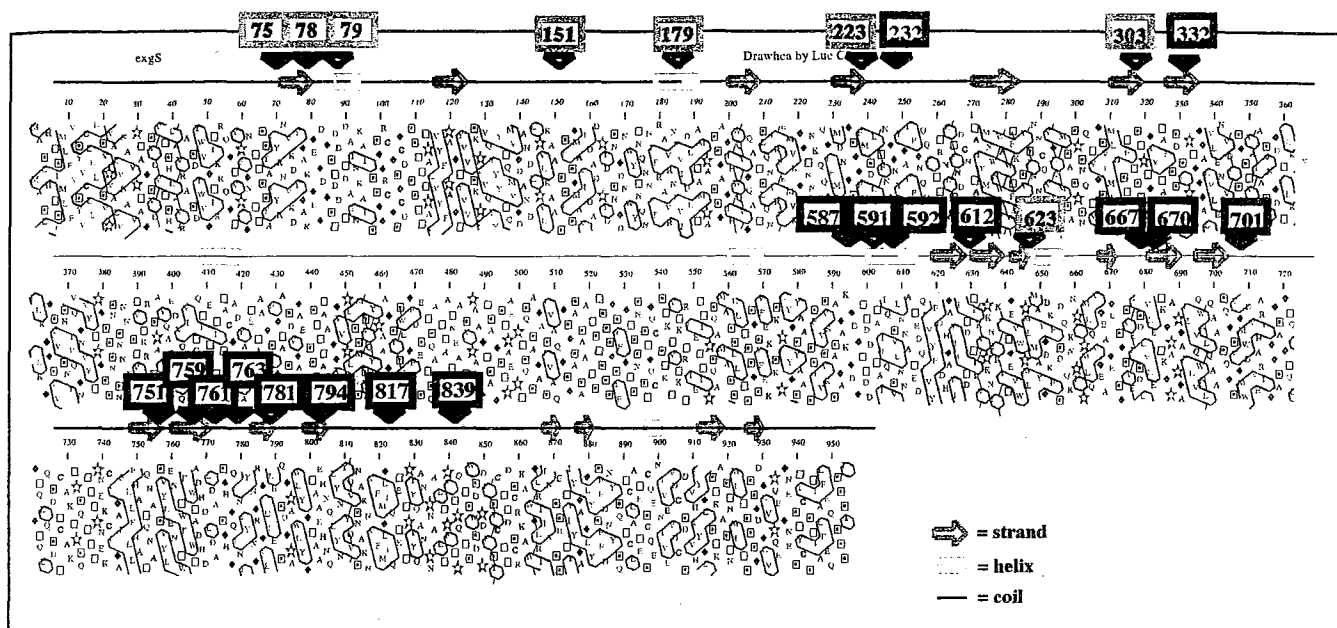


Fig.25 HCA plot of the ExgS from *Aspergillus saitoi* and secondary structure prediction.

Amino acids are represented by their standard one-letter code with the exception of the following residues: proline (asterisk), glycine (closed rhomb), threonine (open square), and serine (open pointed square). Residue numbers are indicated above. The sets of adjacent hydrophobic amino acids (WYMFILV) are contoured. Vertical lines indicate structure-breaking residues. Secondary structure prediction was performed with PSI-prediction(68%accuracy) and PHD-prediction(72%). Only correspond region(helix and strand) with two programs were described.

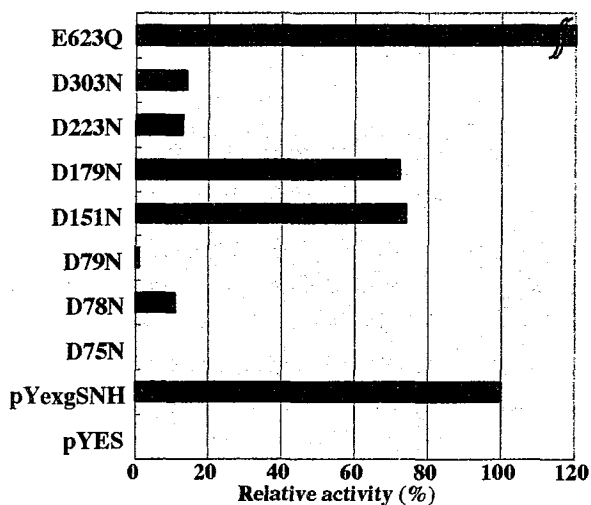


Fig.26 Specific activities of wild-type and mutant β -1,3-glucanase expressed by *S. cerevisiae*. Conserved amino acids were substituted for by asparagine and glutamine, and effect on enzyme activity is shown. Specific activities of the mutant enzyme were determined in standard method and are indicated as a percentage of that of the ExgS (wild type).

論文審査結果要旨

酵母や糸状菌をはじめとする真菌類の細胞壁は主として多糖より構成されており、なかでも真菌の細胞壁の成分の約60%を占める不溶性の β -glucanとchitinは細胞壁の骨格を形成する非常に重要な構造体である。これまでに真菌類の β -1,3-glucanに関しては、化学構造に関する研究、生合成、代謝に関する研究が古くから数多く行われてきた。とりわけ、加水分解酵素 β -1,3-glucanaseは真菌、細菌、高等植物、藻類などに普遍的に存在する事が知られ、多くの研究者により広範囲にわたり調べられている。糸状菌の β -1,3-glucanaseに関しては、笠原・中島らにより麹菌 *Aspergillus saitoi* の $\text{exo-}\beta$ -1,3-glucanase が単離されその性質が明らかにされた。本酵素は、酵母由来の $\text{exo-}\beta$ -1,3-glucanase (Exg) とは β -1,3-glucan に対する作用様式が異なり、 exo 型の分解様式を示すのにもかかわらず β -1,6-結合の分岐をも飛び越して作用するという極めて特異な性質を示した。このことから、糸状菌の分泌型 Exg には特有の作用機作が存在し、その構造が独特のものであることが推定された。

候補者は上記の疑問を明らかにするために、(1) 白麹菌 *Aspergillus saitoi* より $\text{exo-}\beta$ -1,3-glucanase 遺伝子 (*exgS*) のクローニングを行い、その構造を明らかにした。(2) *exgS* を *Aspergillus oryzae* および、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に組み込み、*exgS* の発現産物であることを確認した。

(3) 類縁の糸状菌 *Aspergillus oryzae* の $\text{exo-}\beta$ -1,3-glucanase 遺伝子クローニングを行い全塩基配列を決定し、*Aspergillus* 属特有の遺伝子構造が有ることを示した。(3) *Aspergillus* 属の $\text{exo-}\beta$ -1,3-glucanase (Exg) は、内部に Ser, Thr あるいは Ser, Pro に富む約 180 アミノ酸から成るリンカー領域をもっており、その領域は、分泌される際に切除されている可能性を示した。(4) EST 情報およびマイクロアレイを用いた遺伝子の発現解析により、*Aspergillus* 属の Exg 遺伝子は固相培養特異的に発現することを示した。(5) 部位特異的アミノ酸の置換により活性に関与するアミノ酸残基の探索を行ない、高度に保存された領域内に存在する Asp72, Asp78, Asp79 が基質との結合あるいは活性に関与することを示した。

以上の候補者の研究成果は、糸状菌の $\text{exo-}\beta$ -1,3-glucanase のクローニングと発現に成功した数少ない例として貴重なもので、とくに *Aspergillus* 属の β -1,3-glucanase の遺伝子構造を明らかにしたこと、また構造的普遍性を証明したことは、世界ではじめての成果といえるもので、審査員一同、候補者は博士（農学）の学位を授与されるに充分の資格を有すると認定した。